

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
54637—  
2011

---

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

## Метод определения витамина D<sub>3</sub>

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2013

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом № 184-ФЗ «О техническом регулировании» от 27 декабря 2002 г., а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательским институтом питания РАМН

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 36 «Функциональные пищевые продукты»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2011 г. № 786-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет*

© Стандартиформ, 2013

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

**Содержание**

1 Область применения . . . . .	1
2 Нормативные ссылки . . . . .	1
3 Термины и определения . . . . .	2
4 Сущность метода . . . . .	2
5 Требования безопасности . . . . .	3
6 Условия выполнения испытания . . . . .	3
7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы . . . . .	4
8 Подготовка к выполнению измерений . . . . .	5
9 Выполнение измерений . . . . .	8
10 Обработка и оформление результатов . . . . .	8
11 Метрологические характеристики метода . . . . .	9
Библиография . . . . .	11



## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения витамина D<sub>3</sub>

Functional food products.  
Method of vitamin D<sub>3</sub> determination

Дата введения — 2013—01—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты и устанавливает метод определения массовой доли витамина D<sub>3</sub> (холекальциферола) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой доли витамина D<sub>3</sub> составляет от 0,1 до 1,0 млн<sup>-1</sup>.

П р и м е ч а н и е — Настоящий стандарт допускается распространять на пищевые продукты при условии соблюдения диапазона измерений.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563—2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 52062—2003 Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 52179—2003 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля

ГОСТ Р 52349—2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

- ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия
- ГОСТ 4517—87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе
- ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 8981—78 Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия
- ГОСТ 9293—74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия
- ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
- ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб
- ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия
- ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
- ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
- ГОСТ 19627—74 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия
- ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия
- ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
- ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу
- ГОСТ 27025—86 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний
- ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
- ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

**Примечание** — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52349, а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **содержание витамина D<sub>3</sub>**: Массовая доля холекальциферола, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в миллионных долях (млн<sup>-1</sup>).

### 4 Сущность метода

Витамин D<sub>3</sub> экстрагируют после омыления анализируемой пробы с использованием раствора гидроксида калия. Полученный экстракт используют для выделения методом полупрепаративной нормально-фазной (далее — НФ) ВЭЖХ фракции, содержащей витамин D<sub>3</sub>, и затем проводят анализ с использованием аналитической обращенно-фазной (далее — ОФ) ВЭЖХ. Витамин D<sub>3</sub> детектируют по поглощению в ультрафиолетовой области спектра, пики идентифицируют по их времени удерживания и спектру.

Количественный анализ проводят с помощью метода внутреннего стандарта, используя площадь или высоту пиков. В качестве внутреннего стандарта для определения витамина D<sub>3</sub> используется витамин D<sub>2</sub>.

## 5 Требования безопасности

### 5.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования пожарной безопасности, установленные ГОСТ 12.1.004, электробезопасности — ГОСТ Р 12.1.019, техники безопасности при работе с реактивами — ГОСТ 12.1.007, а также требования, изложенные в технической документации на спектрофотометр, хроматограф, другие приборы и оборудование.

Помещение, в котором проводят испытания, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Контроль за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005.

При работе с газовыми баллонами необходимо руководствоваться [1].

### 5.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке результатов допускаются лица с высшим или средним специальным образованием по профессиям химик, инженер-химик, техник, лаборант, имеющие опыт работы в химической лаборатории. Первое применение метода в лаборатории следует проводить под наблюдением квалифицированного специалиста в области ВЭЖХ.

## 6 Условия выполнения испытания

### 6.1 Общие условия

Испытания проводят в нормальных лабораторных условиях: температура окружающей среды —  $(25 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ; относительная влажность —  $(65 \pm 15) \%$ ; частота переменного тока —  $(50 \pm 5) \text{ Гц}$ ; напряжение в сети —  $(220 \pm 10) \text{ В}$ .

Хранение стандартных веществ проводят в защищенном от света месте и при температуре не выше  $4 ^\circ\text{C}$ .

При приготовлении и хранении растворов следует выполнять требования ГОСТ 27025, ГОСТ 4517.

Для предотвращения разрушения витамина  $D_3$  анализ испытуемой пробы и стандартов проводят в присутствии антиоксиданта (L-аскорбиновой кислоты, гидрохинона, пирогаллола), предохраняя пробы от попадания на них прямого солнечного света.

### 6.2 Условия хроматографического анализа

Температура колонки:  $25 ^\circ\text{C}$  или температура окружающей среды.

Объемная скорость подачи подвижной фазы для НФ и ОФ ВЭЖХ:  $0,7\text{—}1,0 \text{ см}^3/\text{мин}$ .

Объем вводимой пробы для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ:  $0,20\text{—}0,25 \text{ см}^3$ .

Объем вводимой пробы для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ:  $0,1 \text{ см}^3$ .

Подвижная фаза для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ (в объемном соотношении): н-гексан : 2-пропанол (98:2) или н-гексан : 2-пропанол : тетрагидрофуран (98:1:1).

Подвижная фаза для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ (в объемном соотношении) : ацетонитрил : метиловый спирт (80:20) или ацетонитрил : метиловый спирт : метилен хлористый (50:45:5).

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения в условиях полупрепаративной НФ ВЭЖХ осуществляют путем хроматографического анализа раствора анализируемой пробы по 8.2.5. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения пика витамина D от пиков токоферолов матрицы составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других подвижных фаз и колонок.

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения в условиях аналитической ОФ ВЭЖХ осуществляют путем хроматографического анализа смешанного раствора витаминов  $D_2$  и  $D_3$  с массовой концентрацией каждого вещества не менее  $0,5 \text{ мкг}/\text{см}^3$ . Данный раствор готовят из основных растворов по аналогии с методикой приготовления рабочих растворов по 8.1.2.1 и 8.1.2.2. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения соседних пиков витаминов  $D_2$  и  $D_3$  составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других подвижных фаз и колонок.

## 7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

7.1 Для определения массовой доли витамина D<sub>3</sub> применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы:

- весы по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности  $\pm 0,1$  мг;
- спектрофотометр со спектральным рабочим диапазоном от 190 до 1100 нм, основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %;
- кюветы кварцевые с длиной оптического пути 1 см;
- хроматограф для проведения анализа методом полупрепаративной ВЭЖХ, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода пробы; колонку для проведения анализа методом полупрепаративной НФ ВЭЖХ диаметром 0,4—0,46 см, длиной 25—30 см, заполненную силикагелем или силикагелем, модифицированным CN- или NH<sub>2</sub>-группами с размером частиц 5 мкм; спектрофотометрический (длина волны детектирования 265 нм) или диодно-матричный детектор с погрешностью измерений не более 10 % отн., устройство для сбора фракций, регистрирующее устройство (самописец или интегратор), позволяющее проводить измерение площади (или высоты) пика с погрешностью не более 1 %; программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений;
- хроматограф для проведения анализа методом аналитической ВЭЖХ, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода проб; колонку для проведения анализа методом аналитической ОФ ВЭЖХ диаметром 0,40—0,46 см, длиной 25—30 см, заполненную октадецилсиликагелем, с размером частиц 5 мкм; спектрофотометрический (длина волны детектирования 265 нм) или диодно-матричный детектор с погрешностью измерений не более 10 % отн., регистрирующее устройство (самописец или интегратор), позволяющее проводить измерение площади (или высоты) пика с погрешностью не более 1 %; программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений;
- фильтры для фильтрования подвижной фазы и анализируемых растворов (например, с размером пор 0,45 мкм);
- микрошприцы типа «Гамильтон» вместимостью 0,2 см<sup>3</sup> и 0,5 см<sup>3</sup> для ввода проб в жидкостный хроматограф;
- пипетки градуированные 1(2,3)-1(2)-1-0,5(1,2,5,10,25) по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с аналогичными или изменяемыми объемами доз с относительной погрешностью дозирования не более  $\pm 1$  %;
- цилиндры 1-50(100,250)-1(2) по ГОСТ 1770;
- колбы мерные 2-50(100,250,500,1000)-2 по ГОСТ 1770;
- пробирки мерные с притертыми пробками П-2-5(10,15,20,25)-0,1(0,2)ХС по ГОСТ 1770;
- стаканы В(Н)-1-50(100,150,250)ТХС по ГОСТ 25336;
- колбы круглодонные К-1-100(250,500)-29/32ТС по ГОСТ 25336;
- воронки В-36(56)-80ХС, В-75-110(140)ХС, В-100-150ХС по ГОСТ 25336;
- линейка металлическая с ценой деления 1 мм по ГОСТ 427;
- встряхиватель для колб и пробирок с диапазоном частот колебаний платформ 100—150 колебаний в минуту;
- центрифуга, обеспечивающая 4—6 тыс. об/мин;
- баня водяная с регулятором нагрева, поддерживающая температуру от 30 °С до 100 °С;
- баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 дм<sup>3</sup>;
- испаритель ротационный с диапазоном рабочего давления от 7 мм рт. ст. до 760 мм рт. ст. (от  $9 \cdot 10^2$  Па до  $10 \cdot 10^4$  Па) или насос водоструйный по ГОСТ 25336;
- холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336;
- термометр лабораторный жидкостный с диапазоном температур от 0 до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;
- баллон с газообразным азотом по ГОСТ 9293, ос. ч. и [1];
- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;
- плитка электрическая закрытого типа по ГОСТ 14919;
- мельница лабораторная электрическая;
- холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы и материалы:

- абсолютный этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- ректифицированный этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) массовой долей основного вещества не менее 96 % или по ГОСТ Р 51652, ГОСТ 18300;



- метиловый спирт ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- метилен хлористый ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- н-гексан ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- этилацетат ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 8981;
- 2-пропанол ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- тетрагидрофуран ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- петролейный эфир, перегнанный при температуре  $(50 \pm 10)^\circ\text{C}$ , очищенный от перекисей;
- диэтиловый эфир, очищенный от перекисей, содержащий 0,1 % пирогаллола по [2];
- калия гидроксид (KOH) по ГОСТ 24363, х. ч. или ч. д. а., раствор KOH массовой долей 50 %;
- натрий сернокислый ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) безводный, массовой долей основного вещества не менее 99,5 % или по ГОСТ 4166, х. ч.;
- дистиллированную воду по ГОСТ 6709;
- кислоту аскорбиновую ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) по [3] или [4], х. ч.;
- гидрохинон ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ), массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 19627;
- пирогаллол ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ ), массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- бутилгидрокситолуол — БГТ ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ), массовой долей основного вещества не менее 99 %, раствор БГТ в н-гексане массовой концентрацией 2 мг/см<sup>3</sup>;
- эргокальциферол (витамин  $\text{D}_2$ ),  $M(\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}) = 396,7$  г/моль, массовой долей основного вещества не менее 98 %;
- холекальциферол (витамин  $\text{D}_3$ ),  $M(\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}) = 384,6$  г/моль, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

7.3 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

## 8 Подготовка к выполнению измерений

### 8.1 Приготовление растворов

#### 8.1.1 Исходные растворы стандартов

8.1.1.1 Для приготовления исходного раствора витамина  $\text{D}_2$  в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> помещают около 100 мг витамина  $\text{D}_2$ , растворяют в этиловом ректифицированном спирте и доводят до метки спиртом. Этот раствор содержит около 1 мг/см<sup>3</sup> витамина  $\text{D}_2$ . Массовую концентрацию исходного раствора витамина  $\text{D}_2$  уточняют по 8.1.2.1.

8.1.1.2 Для приготовления исходного раствора витамина  $\text{D}_3$  в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> помещают около 100 мг витамина  $\text{D}_3$ , растворяют в этиловом ректифицированном спирте и доводят до метки спиртом. Этот раствор содержит около 1 мг/см<sup>3</sup> витамина  $\text{D}_3$ . Массовую концентрацию исходного раствора витамина  $\text{D}_2$  уточняют по 8.1.2.2.

Приготовленные растворы хранят в темноте при температуре не выше 4 °С.

#### 8.1.2 Рабочие растворы стандартов

8.1.2.1 1 см<sup>3</sup> исходного раствора витамина  $\text{D}_2$ , приготовленного по 8.1.1.1, с помощью пипетки переносят в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки этиловым ректифицированным спиртом. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа. Массовая концентрация рабочего раствора витамина  $\text{D}_2$  составляет 10 мкг/см<sup>3</sup>.

Измерение оптической плотности стандартного раствора витамина  $\text{D}_2$  проводят в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при 265 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый ректифицированный. Для расчета массовой концентрации раствора витамина  $\text{D}_2$  ( $\text{C}_{\text{D}_2}$ , мкг/см<sup>3</sup>) используют уравнение:

$$C_{\text{D}_2} = \frac{A_{265} \cdot 10^6}{100 \cdot 475}, \quad (1)$$

где  $A_{265}$  — значение оптической плотности рабочего раствора витамина  $\text{D}_2$  при 265 нм;

475 — значение оптической плотности раствора витамина  $\text{D}_2$  массовой концентрации 1 г в 100 см<sup>3</sup> при 265 нм в спирте этиловом при толщине поглощающего слоя 1 см ( $E_{1\text{см}}^{1\%}$ );

$10^6$  — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

100 — коэффициент пересчета на 1 см<sup>3</sup>.

8.1.2.2 1 см<sup>3</sup> исходного раствора витамина D<sub>3</sub>, приготовленного по 8.1.1.2, с помощью пипетки переносят в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки спиртом этиловым ректификованным. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа. Массовая концентрация рабочего раствора витамина D<sub>3</sub> составляет 10 мкг/см<sup>3</sup>.

Измерение оптической плотности стандартного раствора витамина D<sub>3</sub> проводят в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при 265 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый ректификованный. Для расчета массовой концентрации раствора витамина D<sub>3</sub> (C<sub>D<sub>3</sub></sub>, мкг/см<sup>3</sup>) используют уравнение:

$$C_{D_3} = \frac{A_{265} \cdot 10^6}{100 \cdot 485}, \quad (2)$$

где A<sub>265</sub> — значение оптической плотности рабочего раствора витамина D<sub>3</sub> при 265 нм;

485 — значение оптической плотности раствора витамина D<sub>3</sub> массовой концентрации 1 г в 100 см<sup>3</sup> при 265 нм в спирте этиловом при толщине поглощающего слоя 1 см (E<sub>1%<sup>1cm</sup></sub>);

10<sup>6</sup> — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

100 — коэффициент пересчета на 1 см<sup>3</sup>.

8.1.2.3 Для приготовления рабочего раствора внутреннего стандарта витамина D<sub>2</sub> 10 см<sup>3</sup> стандартного раствора витамина D<sub>2</sub> по 8.1.1.1 с помощью пипетки помещают в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки спиртом этиловым ректификованным. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Массовая концентрация рабочего раствора витамина D<sub>2</sub> составляет 1 мкг/см<sup>3</sup>.

8.1.2.4 Для приготовления рабочего раствора смеси витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>, необходимого для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ, помещают 5 см<sup>3</sup> рабочего раствора витамина D<sub>2</sub> по 8.1.2.1 и 5 см<sup>3</sup> рабочего раствора витамина D<sub>3</sub> по 8.1.2.2 в колбу ротормного испарителя. Растворитель тщательно упаривают на водяной бане при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток перерастворяют в 50 см<sup>3</sup> n-гексана или подвижной фазы, используемой для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ. Массовая концентрация витамина D<sub>2</sub> (D<sub>3</sub>) в растворе составляет 1 мкг/см<sup>3</sup>.

8.1.2.5 Из исходных растворов готовят не менее четырех рабочих растворов витамина D<sub>3</sub> в диапазоне концентраций 0,1—10,0 мкг/см<sup>3</sup>, используемых для построения градуировочного графика по 8.4. Для этого 1,0 см<sup>3</sup> и 10,0 см<sup>3</sup> рабочего раствора витамина D<sub>3</sub> по 8.1.2.2 с помощью пипетки помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и растворы доводят до метки спиртом этиловым абсолютным (массовая концентрация полученных растворов витамина D<sub>3</sub> составляет 0,1 мкг/см<sup>3</sup> и 1,0 мкг/см<sup>3</sup>), а также 0,5 см<sup>3</sup> и 1,0 см<sup>3</sup> исходного раствора витамина D<sub>3</sub> по 8.1.1.2 помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и растворы доводят до метки спиртом этиловым абсолютным (массовая концентрация полученных растворов витамина D<sub>3</sub> составляет 5,0 мкг/см<sup>3</sup> и 10,0 мкг/см<sup>3</sup>).

## 8.2 Отбор и подготовка проб

8.2.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 26809, ГОСТ Р 52062, ГОСТ Р 52179.

8.2.2 Крупные частицы средней пробы, выделенной методом квартования из лабораторной пробы, измельчают с использованием подходящего оборудования (например, лабораторной мельницы) до такого состояния, чтобы весь продукт проходил через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Размолотую пробу тщательно перемешивают.

Анализируемые пробы гомогенизируют, избегая воздействия повышенной температуры.

8.2.3 Для омыления испытуемой пробы, содержащей менее 30 % жира, 5—20 г исследуемого материала помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100—500 см<sup>3</sup>, добавляют 90—100 см<sup>3</sup> этилового ректификованного спирта, 1 г аскорбиновой кислоты (или 1 г пирогаллола), 50 см<sup>3</sup> 50 %-ного раствора гидроксида калия. Перед омылением в колбу вносят соответствующее количество раствора внутреннего стандарта. Количество витамина D<sub>2</sub> должно быть близким к ожидаемому количеству витамина D<sub>3</sub> в анализируемом образце. Омыление проводят в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником (желательно в токе азота) при температуре 70 °С—80 °С.

При проведении щелочного гидролиза при комнатной температуре в течение не менее 16 ч используют вышеуказанные соотношения материала и реактивов.

8.2.4 Для омыления испытуемой пробы, содержащей более 30 % жира, в колбу для омыления вносят 5—20 г исследуемого материала, добавляют 90—100 см<sup>3</sup> спирта этилового, примерно 1 г аскорбиновой кислоты (или 1 г пирогаллола), 50 см<sup>3</sup> 50 %-ного раствора гидроксида калия. Перед омылением в колбу вносят соответствующее количество раствора внутреннего стандарта витамина D<sub>2</sub>, количество которого должно быть близким к ожидаемому количеству витамина D<sub>3</sub> в анализируемом образце. Омыление проводят на водяной бане в течение 30—45 мин (желательно в токе азота) при температуре 95 °С—100 °С.

Рекомендуемое добавляемое количество внутреннего стандарта приведено в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 — Количество добавляемого внутреннего стандарта витамина D<sub>2</sub>

Заявленное содержание витамина D <sub>2</sub> , мг/л	Навеска пробы, г	Количество вносимого раствора внутреннего стандарта, см <sup>3</sup>
От 0,1 до 0,3 включ.	20	3
Св. 0,3 до 0,6 включ.	10	3
Св. 0,6 до 1,0 включ.	5	2

Если после омыления и охлаждения жир или масло остаются на поверхности омыляемой смеси, то вновь приливают 50 см<sup>3</sup> 50 %-ного раствора КОН и омыление повторяют.

После окончания гидролиза, проведенного по 8.2.3 (8.2.4), содержимое колбы быстро охлаждают до (20 ± 5) °С и количественно переносят в делительную воронку. Витамин D экстрагируют 100 см<sup>3</sup> н-гексана (этилацетата, петролейного или диэтилового эфира).

Для удаления воды экстракт фильтруют через фильтр с 2—5 г безводного сульфата натрия. Фильтр промывают 20 см<sup>3</sup> н-гексана, затем добавляют в фильтрат 1 см<sup>3</sup> раствора (2 мг/см<sup>3</sup>) БГТ в н-гексане. Экстракт промывают 3—5 раз порциями воды по 50—100 см<sup>3</sup> до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по универсальной индикаторной бумаге) и затем упаривают с помощью роторного испарителя при пониженном давлении и при температуре не выше 40 °С.

8.2.5 Для приготовления раствора исследуемого образца для анализа с помощью полупрепаративной НФ ВЭЖХ к сухому остатку после упаривания экстракта приливают 2 см<sup>3</sup> н-гексана (или другого растворителя или смеси растворителей, которые используются в качестве подвижной фазы в системе полупрепаративной ВЭЖХ).

8.2.6 Для выделения фракции, содержащей витамин D, 0,2—0,5 см<sup>3</sup> раствора по 8.2.5 элюируют в условиях полупрепаративной ВЭЖХ и собирают элюат, содержащий смесь витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> (в условиях НФ ВЭЖХ эти соединения элюируются одновременно), предварительно определив время удерживания этих соединений по 8.3. Время удерживания витамина D зависит от используемых подвижных и неподвижных фаз и обычно составляет 10—15 мин. Общее время хроматографического разделения составляет 25—30 мин.

8.2.7 Фракцию элюата, полученную по 8.2.6, упаривают на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре не более 40 °С, и сухой остаток перерастворяют в 0,5 см<sup>3</sup> подвижной фазы для аналитической ОФ ВЭЖХ.

### 8.3 Подготовка жидкостных хроматографов

Подготовку жидкостных хроматографов к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации оборудования. Перед началом работы колонки промывают элюентом.

Раствор смеси витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> по 8.1.2.4 несколько раз вводят в хроматограф для полупрепаративного анализа и проверяют повторяемость времени удерживания витамина D (в варианте НФ ВЭЖХ витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> элюируются одновременно). Хроматографические условия оптимизируют для оптимального разделения пика витамина D от пиков токоферолов и других соединений матрицы.

Раствор смеси витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> по 8.1.2.6 несколько раз вводят в хроматограф для варианта аналитической ОФ ВЭЖХ и проверяют повторяемость полного разделения пиков витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> (степень разделения пиков должна быть не менее 1,0). Условия хроматографирования также должны обеспечивать оптимальное отделение пиков витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> от пиков других соединений матрицы.

### 8.4 Построение градуировочной зависимости

Процедуры построения градуировочной зависимости выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя по программному обеспечению.

Градуировочный график строят в координатах «аналитический сигнал, mAU · с (AU · с) или мм» — «массовая концентрация витамина в градуировочном растворе, мкг/см<sup>3</sup>». Для каждого анализируемого градуировочного раствора проводят два параллельных измерения и находят среднеарифметическое значение. Различие между измеренными значениями аналитических сигналов и времени удерживания не должно превышать 5 % средних значений. Линейные участки градуировочного графика должны соот-

ветствовать всему диапазону определяемых концентраций витамина  $D_3$ . Коэффициент градуировочного графика  $k_{гр}$  определяют как среднеарифметическое значение коэффициентов  $k_i$ , вычисляемых по формуле

$$k_i = \frac{C_i}{S_i} \quad (3)$$

где  $C_i$  — массовая концентрация микронутриентов в  $i$ -м градуировочном растворе, мкг/см<sup>3</sup>;

$S_i$  — площадь пика  $i$ -го градуировочного раствора, мAU · с (AU · с) или высота, мм.

Проводят хроматографический анализ не менее четырех рабочих стандартных растворов витамина  $D_3$ , приготовленных по 8.1.2.5.

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется значением достоверной аппроксимации  $R^2 \geq 0,997$ .

Градуировка проводится в следующих случаях: на этапе освоения метода, при изменении условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

## 9 Выполнение измерений

В колонку хроматографа для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ последовательно вводят равные объемы испытуемого раствора по 8.2.7 и одного из градуировочных растворов по 8.1.2.5.

Идентификацию пиков проводят, сопоставляя время удерживания, спектры в УФ-диапазоне длин волн или соотношения интенсивности сигнала детектора при различных длинах волн для соответствующих пиков стандартов и определяемых соединений.

## 10 Обработка и оформление результатов

Поправочный коэффициент  $k$  рассчитывают с помощью метода внутреннего стандарта по формуле

$$k = \frac{S_{\text{вн.ст}} \cdot C_x}{S_x \cdot C_{\text{вн.ст}}} \quad (4)$$

где  $S_{\text{вн.ст}}$  — площадь (мAU · с или AU · с) или высота (мм) пика внутреннего стандарта витамина  $D_2$ ;

$S_x$  — площадь (мAU · с или AU · с) или высота (мм) пика определяемого витамина  $D_3$ ;

$C_{\text{вн.ст}}$  — массовая концентрация внутреннего стандарта витамина  $D_2$  по 8.1.2.3, мкг/см<sup>3</sup>;

$C_x$  — массовая концентрация определяемого витамина  $D_3$ , мкг/см<sup>3</sup>.

Массовую долю витамина  $D_3$  в анализируемом образце  $X$ , млн<sup>-1</sup>, рассчитывают по формуле

$$X = k \cdot \frac{m_{\text{вн.ст}} \cdot S_x}{m_{\text{пр}} \cdot C_{\text{вн.ст}}} \quad (5)$$

где  $m_{\text{вн.ст}}$  — масса внутреннего стандарта (витамина  $D_2$ ), добавленного к навеске пробы анализируемого образца, мг;

$m_{\text{пр}}$  — масса пробы, взятой для омыления, кг;

$S_{\text{вн.ст}}$  — площадь (мAU · с или AU · с) или высота (мм) пика внутреннего стандарта витамина  $D_2$ ;

$S_x$  — площадь (мAU · с или AU · с) или высота (мм) пика определяемого витамина  $D_3$ ;

$k$  — поправочный коэффициент, рассчитанный по формуле 4.

Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

Каждую пробу анализируют дважды, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Расхождение между результатами двух параллельных измерений  $X_1$ ,  $X_2$  (в процентах от среднего значения  $X_{ср}$ ), выполненными одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени, не должно превышать норматива контроля сходимости  $r$  с доверительной вероятностью 95 %.

При соблюдении этого условия за окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение  $X_{ср}$ .

Границы относительной погрешности определения массовой доли витамина  $D_3 \pm \delta$ , в процентах от результата испытания, и при доверительной вероятности 95 % не должны превышать значений, указанных в таблице 2.

Результат определения витамина D<sub>3</sub> представляют в следующем виде:

$$X_{\text{ср}} \pm \Delta, \text{ млн}^{-1} \text{ при } P = 95 \%, \quad (6)$$

где  $X_{\text{ср}}$  — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений,  $\text{млн}^{-1}$ ;

$\Delta$  — значение границы абсолютной погрешности определений,  $\text{млн}^{-1}$ , рассчитанное по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X_{\text{ср}}}{100}, \quad (7)$$

где  $\delta$  — значение границы относительной погрешности измерений, % (таблица 2).

## 11 Метрологические характеристики метода

### 11.1 Повторяемость

Каждую пробу анализируют дважды, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Расхождение между результатами двух параллельных измерений ( $X_1, X_2$ ), выполненными одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени считают удовлетворительным, если  $|X_1 - X_2| \leq 0,01 \cdot r \cdot X_{\text{ср}}$ , где  $X_{\text{ср}}$  — среднеарифметическое значение. Значение  $r$  (предел повторяемости) приведено в таблице 2.

При превышении  $r$  испытание повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

### 11.2 Воспроизводимость

Пробу делят на две равные части. Расхождение между результатами двух определений ( $X_1, X_2$ ), выполненными разными операторами в разное время с использованием различных реактивов и оборудования, считают удовлетворительным, если  $|X_1 - X_2| \leq 0,01 \cdot R \cdot X$ , где  $X$  — среднеарифметическое значение. Значение  $R$  (предел воспроизводимости) приведено в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 — Основные метрологические характеристики метода

Метрологическая характеристика ( $P = 0,95$ )	Диапазон измерений, $\text{млн}^{-1}$	
	от 0,1 до 0,5 включ.	св. 0,5 до 1,0 включ.
Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ , %	8,8	7,1
Предел повторяемости $r$ , %	25	20
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , %	10,6	8,8
Предел воспроизводимости $R$ , %	30	25
Границы относительной погрешности ( $\pm \delta$ ), %	25	20
Предел обнаружения, $\text{млн}^{-1}$	0,03	

При превышении  $R$  испытание повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

### 11.3 Контроль погрешности результатов испытаний

Контроль погрешности (точности) результатов испытаний проводят методом добавок. Пробу делят на две равные части. В одну из них добавляют стандарт витамина D<sub>3</sub> в количестве, составляющем 50 %—150 % от исходного содержания компонента в пробе, и проводят испытания в соответствии с настоящим стандартом.

Результаты испытаний признают удовлетворительными, если погрешность определения массовой доли витамина D<sub>3</sub> в добавке не превышает норматива оперативного контроля погрешности  $K_{\text{доб}}$ ,  $\text{млн}^{-1}$ :

$$|X_{\text{доб}} - X_{\text{ср}} - c_{\text{доб}}| \leq K_{\text{доб}}, \quad (8)$$

где  $X_{\text{доб}}$  — среднеарифметическое значение результатов двух испытаний пробы с добавкой,  $\text{млн}^{-1}$ ;

$X_{\text{ср}}$  — среднеарифметическое значение результатов двух испытаний пробы без внесения добавки,  $\text{млн}^{-1}$ ;

$c_{\text{доб}}$  — массовая доля добавки,  $\text{млн}^{-1}$ .



При проведении внутрилабораторного контроля значение  $K_{\text{доб}}$  рассчитывают (при доверительной вероятности 90 %) по формуле

$$K_{\text{доб}} = 0,84 \cdot \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{\text{доб}}^2 + X_{\text{ср}}^2}, \quad (9)$$

где  $\delta$  — значение границы относительной погрешности определения массовой доли витамина D<sub>3</sub>, указанное в таблице 2.

При проведении межлабораторного контроля значение  $K_{\text{доб}}$  рассчитывают (при доверительной вероятности 95 %) по формуле

$$K_{\text{доб}} = \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{\text{доб}}^2 + X_{\text{ср}}^2}. \quad (10)$$

#### 11.4 Контроль стабильности результатов при реализации методики в лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3) с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов измерений должны быть предусмотрены в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 (подраздел 4.2) и ГОСТ Р 8.563 (пункт 7.1.1).

## Библиография

- [1] ПВ 10-115—96 Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением
- [2] ГФ СССР X, ст. 34 Эфир медицинский
- [3] ГФ СССР X, ст. 6 Кислота аскорбиновая (витамин С)
- [4] ФС 42-2668—95 Кислота аскорбиновая (витамин С)

Ключевые слова: продукты пищевые функциональные, витамин D<sub>3</sub>, холекальциферол, определение содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография

---

Редактор *Л.В. Коретникова*  
Технический редактор *Н.С. Гришанова*  
Корректор *Ю.М. Прокофьева*  
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 10.12.2012. Подписано в печать 30.01.2013. Формат 60 × 84  $\frac{1}{8}$ . Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 225 экз. Зак. 96.

---

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)  
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.  
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.